Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Nachweis von Gonadotropin-Inhibitor-Aktivität im Urin von Kindern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Maria Schneider
aus Scherlowitz/CSR

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0114

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Nachweis von Gonadotropin-Inhibitor-Aktivität im Urin von Kindern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Maria Schneider
aus Scherlowitz/CSR

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Dozent Dr. med. R. Blobel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Roemer

3. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Lempp

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Herrn Professor Dr. Roemer danke ich dafür, daß ich die Arbeit an seiner Klinik durchführen konnte.

Herrn Dozent Dr. Blobel danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für seine Hilfe und seinen Rat, mit denen er mir bei der Durchführung der Arbeit freundlich zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis:

Seite

I. Einleitung und Fragestellung:

1. Steuerung der Gonadotropinsekretion beim Erwachsenen 1
2. Gonadotropinsekretion in der Kindheit und Pubertät 4
3. Nachweis von GIA im Urin von Kindern, Erwachsenen, Patienten mit Stein-Leventhal-Syndrom und hypogonadotropem Hypogonadismus 7
4. Nachweis von GIA im Serum von Kindern 9
5. Nachweis von GIA im Urin von Affen 10
6. Wirkung von GIA im Tierversuch und die Frage nach der Toxicität des Urinextraktes 10
7. Unterschiedliche Gonadotropin- bzw. Gonadotropin-Inhibitor-Ausbeute bei verschiedenen Extraktionsmethoden 12
8. Fragestellung 14

II. Material und Methoden:

1. Urin von gesunden Kindern im Alter von 3 - 14 Jahren 15
2. HCG-Standard-Präparat 15
3. Kaolin-Alkohol-Extraktionsmethode nach Bradbury, Brwon and Brown 15
4. Mäuse-Uterus-Test 16
5. immunologischer GIA-Nachweis mit Pregnosticon-Test 18
6. Gelfiltration mit Sephadex G-100 18
7. Statistische Auswertung 19

Seite

III. Ergebnisse:

1. HCG-Standard-Kurve 22
2. Gonadotropin-Bestimmung 24
3. GIA-Bestimmung: in vivo 24
   in vitro 25
   immunologisch 26
4. Beeinflussung von GIA durch Trasylol 27
5. Beeinflussung von GIA durch Imuran 28
6. Gelfiltration mit Sephadex G-100 29

IV. Diskussion:

1. Gonadotropin-Ausscheidung bei Kindern im Alter von 3 - 14 Jahren 31
2. Konzentrationsabhängigkeit von GIA 32
3. Altersabhängigkeit von GIA 33
4. Vergleich der Ergebnisse des In-vivo und In-vitro-Testes 36
5. Vergleich der Ergebnisse bei Trasylol- bzw. Imuran-Zusatz 38
6. immunologischer Test 40
7. Gelfiltration mit Sephadex G-100 40
8. toxische Wirkung des Extraktes 41

V. Zusammenfassung: 43

Literaturverzeichnis 45

Abkürzungen:

GIA	Gonadotropin-Inhibitor-Aktivität
HCG	Human Choriongonadotropin
HMG	Human Menopausal Gonadotropin
LH	Luteinisierendes Hormon
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
LTH	Luteotropes Hormon
ICSH	Interstitialzellenstimulierendes Hormon
-RF	Releasing Factor
KIE	Kallikrein-Inaktivator-Einheit

I. Einleitung und Fragestellung:

1. Steuerung der Gonadotropinsekretion beim Erwachsenen:

Die Gonadotropine sind den Geschlechtshormonen übergeordnete, geschlechtsunspezifische Proteohormone, die im Hypophysenvorderlappen gebildet werden und die die Keimdrüsen regulieren.
Man unterscheidet drei, in ihrem chemischen Aufbau und ihrer Wirkung unterschiedliche gonadotrope Hormone:

1. das follikelstimulierende Hormon,
2. das luteinisierende Hormon, identisch mit interstitialzellenstimulierendem Hormon,
3. das luteotrope Hormon, identisch mit Prolaktin.

Bei der Frau werden die cyclischen Veränderungen im Ovar von den Gonadotropinen gesteuert: Das FSH regt die Granulosazellen der Ovarien zum Wachstum an, löst allein aber noch keine Follikelhormonproduktion aus. Unter dem zusätzlichen Einfluß vom LH kommt es zur Follikelhormonproduktion in den Thekazellen, zum Heranreifen einiger Follikel und mit steigenden Mengen von LH zur Reifung eines Follikels, schließlich zur Ovulation und zur Umwandlung des geplatzten Follikels in ein Corpus luteum. Das LTH unterhält die Progesteronbildung in den luteinisierten Zellen der Corpora lutea. (MARTIUS 1964)
Beim Mann bewirkt FSH das Wachstum der Tubuli seminiferi und die Spermiogenese und ICSH die Sekretion von Androgenen durch die Leydig -

Zellen. (BUTT 1964)
Schon seit ca 40 Jahren ist bekannt, daß die cyclischen Veränderungen des Ovars auf ein hormonales Wechselspiel zwischen diesem Organ und der Hypophyse zurückzuführen sind. (LABHART 1957)
Danach gilt, daß das Maß der hypophysären Tropinsekretion in reziproker Abhängigkeit von der Blutkonzentration der Erfolgsdrüsenhormone steht.
Doch heute weiß man, daß der Hypothalamus Funktionen besitzt, die dem Hypophysenvorderlappen-Gonaden-System übergeordnet sind. In den hypophyseotropen Zentren des Hypothalamus werden die Gonadotropin-Releasing-Faktoren, die die Sekretion der hypophysären Gonadotropine steuern, gebildet und in das Pfortadersystem der Hypophyse abgegeben. (APOSTOLAKIS 1957)
Diese GRF stimulieren nicht nur die Freisetzung, sondern auch die Synthese von Gonadotropinen.
Die GRF-Sekretion wird durch die Sexualhormonkonzentration im Blut über den Feedback-Mechanismus bestimmt.
Auf Grund tierexperimenteller Untersuchungen weiß man, daß die Gonadenfunktion neben diesen beiden Reglermechanismen, Hypophyse---Ovar---Hypophyse, und Hypothalamus---Hypophyse---Ovar---Hypothalamus, noch von einem dritten, dem sog. kleinen Rückkopplungsmechanismus, gesteuert wird:
Hypophyse---Hypothalamus---Hypophyse.
(BLOBEL, SCHLUMBERGER 1964)
Doch scheint die Funktion der Gonaden und insbesondere die Gonadotropinwirkung noch von weiteren Faktoren beeinflußt zu werden. Gerade in den letzten Jahren wird von einigen Forscher-

gruppen auf Substanzen hingewiesen, die die Wirkung der Gonadotropine auf die Gonaden zu hemmen vermögen.
1961 gelang es WOODS und SIMPSON in gereinigtem HVL-Extrakt eine Substanz nachzuweisen, die den stimulierenden Effekt der Gonadotropine auf Mäuseovarien hemmt. Dieser Gonadotropinantagonist läßt sich in der Reindarstellung von ICSH nicht entfernen und ist noch in allen Präparaten vorhanden. Rinderpinealextrakt inhibiert den stimulierenden Effekt von menschlichem Menopausen- und Choriongonadotropin auf den Mäuseuterus. (SOFFER 1965) PAVEL (1966) nimmt an, daß diese inhibierenden Substanzen aus Rinderzirbeldrüsen mit Arginino-Vasopressin identisch sind; denn gereinigtes Pineal-Arginino-Vasopressin unterdrückt die Wirkung von Gonadotropin auf Mäuseuterus bzw. Mäuseovar ebenso wie synthetisches Arginino-Vasopressin. Auf Grund von Versuchen an Ochsen und Schafen konnte SAKIZ (1964) beweisen, daß synthetisches Arginino-Vasopressin die Aktivität von LH-RF steigert, LH aber unbeeinflußt läßt.
Bei der Einwirkung der Epiphyse auf die Funktion des HVL ist nicht sicher erwiesen, ob es sich dabei um einen spezifisch-epiphysären Effekt handelt, oder ob auch in der Epiphyse Substanzen gebildet werden, wie in anderen Hirnarealen, die die gonadotrope Partialfunktion des HVL beeinflussen können. (BLOBEL, SCHLUMBERGER 1967)

2. Gonadotropinsekretion in der Kindheit und Pubertät:

Der Mechanismus über die Auslösung der Gonadotropinsekretion zur Zeit der Pubertät ist noch nicht völlig geklärt.
Der Hypothalamus wird als die Stelle angesehen, die dafür verantwortlich ist, daß hypophysäre Gonadotropine in relativ kleinen Mengen während der Kindheit, in größeren Mengen beim Erwachsenen freigesetzt werden. (APOSTOLAKIS 1957)
Mit den üblichen Methoden ist Gonadotropin im Kinderharn nicht nachzuweisen. Durch Zugabe einer geringen Dosis HCG, die allein noch unwirksam ist, kann man jedoch eine Potenzierung der HCG-Wirkung feststellen. Mit dieser Methode soll nach KNAPPE (1961) auch bei jüngeren Kindern eine Gonadotropinausscheidung nachzuweisen sein.
Der Gonadotropinnachweis, ohne HCG-Zugabe, im Urin gelingt etwa 2,5 Jahre vor der Pubertät, d.h. Stimmbruch bzw. Menarche. Bei Mädchen sind die Gonadotropine im Harn im Durchschnitt 1 Jahr früher als bei Knaben zu finden. Nachweisbarkeit von Gonadotropinen vor dem 9. bzw. 10. Lebensjahr und ihr Fehlen nach dem 13. bzw. 14. Lebensjahr ist als pathologisch zu werten.(JOHNSEN 1959)
YEN u.a. (1969) konnten bei Kindern ab dem 8. Lebensjahr LH im Serum nachweisen und fanden, daß seine Konzentration bei Mädchen bis zum 14. Lebensjahr um das Neunfache ansteigt (von 1,87 auf 11,9 mIU/ml Serum), bei den Knaben jedoch nur um das Dreifache.
Bei Mädchen liegt die Gonadotropin-Aktivität

auch im Urin höher als bei Knaben.
Genaue, statistisch vergleichbare Werte liegen aber in der Literatur nicht vor.
Mit zunehmendem Alter verschiebt sich des Verhältnis FSH/LH zugunsten von LH. Der Quotient FSH/LH beträgt bei Kindern von 2 Jahren etwa 5 und sinkt bis zum Erwachsenenalter allmählich auf 1 ab. Die LH-Ausscheidung steigt wesentlich mehr an als die FSH-Ausscheidung. (RIFKIND 1967)
Bisher konnte jedoch noch nicht geklärt werden, welcher Mechanismus zu einem Ansteigen der Gonadotropinsekretion in der Pubertät bzw. zur Sexualhormonproduktion führt.
Nach VOGT (1966) sind die kindlichen Gonaden erst nach der "Umschaltung" im Hypothalamus ansprechbar.
PRESL und Mitarbeiter (1963) konnten an postpartalovariektomierten Ratten nachweisen, daß der Feedback-Mechanismus zwischen dem Ovar und dem Zwischenhirn-Hypophysen-System schon lange vor der Geschlechtsreife existiert.
WERFF TEN BOSCH (1966) nimmt an, daß die Receptoren im Hypothalamus im Kindesalter eine größere Empfindlichkeit gegenüber Sexualsteroiden haben als bei Erwachsenen; d.h.: schon geringe Plasmakonzentrationen von Sexualhormonen (evt. aus der NNR) wirken sich im Feedback-Mechanismus hemmend auf den Hypothalamus aus. Eine Abnahme der Empfindlichkeit des Hypothalamus auf Sexualhormone wäre demnach als auslösendes Moment für die Pubertät zu betrachten.
Nach BIERICH (1967) ist das Relais, das den Sexualhormonspiegel registriert und gleichzeitig die erhaltenen Informationen in regulatorische Impulse,

d.h. Hemmung oder Nicht-Hemmung der Sekretion des Releasingfactors transformiert, außerhalb des Sexualzentrums gelegen: dieses Kontrollzentrum, in dem sich der eigentliche Vorgang der Reifung abspielt, findet sich höchstwahrscheinlich im Epithalamus in der Gegend der Pinealis.
Auf Grund der Beobachtung, daß Tumoren der Zirbeldrüse Pubertas praecox verursachen, vermuteten KITAY und ALTSCHULE (1954), daß die Zirbeldrüse die Funktion der Geschlechtsorgane direkt hemmt oder die Sekretion der hypophysären Gonadotropine unterdrückt. (zitiert nach WERFF TEN BOSCH)
Weiterhin vermutete man, daß Substanzen der Epiphyse, das Melatonin und das 5-Methoxytryptophan, die Ovarialfunktion vor der Geschlechtsreife hemmen.
Doch gerade in den neueren Arbeiten wird immer wieder auf eine gonadotropin-inhibierende Substanz hingewiesen, die man im Harn von Kindern und Erwachsenen nachweisen kann.
Die Tatsache, daß Urinextrakte von Kindern eine höhere Gonadotropininhibitor-Aktivität haben, als die von Erwachsenen, läßt vermuten, daß diese Substanz in der Physiologie der Pubertät eine entscheidende Rolle spielt. (ORLANDI 1964)
Dieser Gonadotropin-Inhibitor wird als Ursache für die niederen Gonadotropinwerte bei Kindern angesehen. (APOSTOLAKIS 1961)

3. Nachweis von GIA im Urin von Kindern, Erwachsenen, Patienten mit Stein-Leventhal-Syndrom und hypogonadotropem Hypogonadismus:

Bereits 1960 führten LANDAU und Mitarbeiter die Unmöglichkeit, im Urin von Kindern direkt Gonadotropine nachweisen zu können, auf die Anwesenheit spezifischer Hemmfaktoren zurück.
1961 konnte SOFFER nachweisen, daß der Urinextrakt von Kindern unter 6 Jahren nur auf HCG, nicht aber auf Östrogen inhibitorisch wirkt. Zerstört man im Extrakt aus Urin von Erwachsenen die Gonadotropin- und Östrogenaktivität, so ist auch hier GIA zu finden. (SOFFER 1963, SAITO 1965)
SAITO stellte 1965 GIA im Urin von Kindern bis zu 12 Jahren in höheren Konzentrationen fest, als bei Erwachsenen. Eine Änderung der GIA-Ausscheidung mit zunehmendem Lebensalter des Mannes ist aus vorliegenden Arbeiten nicht zu ersehen, während nach JOHNSEN (1959) die Gonadotropinausscheidung beim Mann mit zunehmendem Alter ansteigen soll.
Im Gegensatz dazu konnten LORAINE (1958) und BROWN(1959) allerdings weder eine Anderung der Gonadotropinausscheidung, noch eine Verschiebung des Verhältnisses FSH/ICSH im Laufe des Lebens feststellen.
SOFFER (1964) fand bei der Frau cyclische Schwankungen in der GIA-Ausscheidung, die mit der unterschiedlichen Gonadotropinausscheidung in Beziehung stehen: die GIA-Ausscheidung sinkt vom 1. - 7. Cyclustag, ist vom 7. - 9. Tag nicht nachzuweisen, und steigt dann bis zur Cyclusmitte auf ihren maximalen Wert an, um dann bis Cyclusende wieder

etwas abzusinken. Das Verhältnis FSH/LH verschiebt sich in der Cyclusmitte zugunsten von LH. (ARTHUR 1958) Da GIA nur exogen zugeführte Gonadotropine (WEISER 1968) mit LH-ähnlicher und nicht jene mit FSH-ähnlicher Wirkung hemmt, (SOFFER 1963, LANDAU 1965) nimmt man an, daß der Abfall bzw. das Fehlen von GIA vom 7. - 9. Cyclustag im Zusammenhang steht mit dem LH-Anstieg zur Zeit der Ovulation: das Absinken von GIA soll die Voraussetzung für den Anstieg von LH in der Cyclusmitte sein. (SOFFER 1964)
Während die Gonadotropinaktivität nach der Menopause ansteigt, (JOHNSEN 1959) und das Verhältnis FSH/LH sich zugunsten von FSH verschiebt, konnte SOFFER (1962) vor und nach der Menopause keinen Unterschied in der GIA-Ausscheidung feststellen.

Bei Patientinnen mit Stein-Leventhal-Syndrom ist GIA im Urin, verglichen mit gesunden Frauen, erniedrigt bzw. nicht nachweisbar. (SOFFER 1964) Die Ausscheidung der hypophysären Gonadotropine liegt bei diesen Patientinnen über der Norm. (CHAMBERLAIN 1964) Die erhöhten Gonadotropinwerte entstehen durch eine erhöhte ICSH-Ausscheidung (SOFFER 1964);man glaubt, daß dieses Syndrom, sekundäre Amenorrhoe, Sterilität, doppelseitige polycystische Ovarien und Hirsutismus, durch einen unkontrollierten ICSH-Einfluß auf die Ovarien zustandekommt. Als dessen Ursache sieht SOFFER den GIA-Mangel: die Bedeutung von GIA soll also in der Steuerung der ICSH-Wirkung auf die Ovarien liegen. (SOFFER 1964, WEISER 1968)

Bei NNR-Hyperplasie zeigt die GIA-Ausscheidung keine Abweichung von der Norm. (SOFFER 1964)

LANDAU (1964) konnte nachweisen, daß Urinextrakt von Patienten mit hypogonadotropem Hypogonadismus GIA enthält, die sowohl die Wirkung von HCG, als auch von HMG am Mäuseuterus hemmt, im Gegensatz zu GIA aus Kinderharn, die nur eine spezifische inhibitorische Wirkung auf HCG ausübt.

GIA ist hitzestabil und unlöslich in 95%igem Alkohol und Äther. (SOFFER 1962) Auch ein pH von 1 und 120°C bewirken keinen vollständigen Verlust der gonadotropininhibierenden Eigenschaft dieser Substanz. (DAVIS 1966)
LANDAU (1965) gelang es allerdings, GIA unter denselben Bedingungen zu zerstören.

4. Nachweis von GIA im Serum von Kindern:

REISS und Mitarbeiter fanden 1964 im Serum und in der Cerebrospinalflüssigkeit körperlich und geistig retardierter Kinder Substanzen, die die HCG-Wirkung am Mäuseuterus hemmen. Doch auch das Serum gesunder Kinder im Alter von 3 - 5 Jahren übt eine inhibitorische Wirkung auf HCG aus.

5. Nachweis von GIA im Urin von Affen:

SAIRAM (1966) wies einen Gonadotropin-Inhibitor im Affenurin nach: er fand, daß dieser eine spezifische Hemmwirkung auf FSH und nicht auf LH ausübt. 1968 gelang es ihm, diesen FSH-Inhibitor hochgradig zu reinigen: der gereinigte Inhibitor ist frei von LH-Aktivität; sein Molekulargewicht beträgt 6500; er kann durch Hitze, extreme pH-Werte und denaturierenden Substanzen zerstört werden.

6. Wirkung von GIA im Tierversuch und die Frage nach der Toxicität:

GIA läßt sich im Tierversuch mit verschiedenen Methoden nachweisen. Von den meisten Forschern wurde die Mäuse-Uterus-Gewicht-Methode angewandt, wie sie zur Bestimmung der Gonadotropinaktiviät im Urin üblich ist. (KLINEFELTER 1943)
In den Versuchen zur Inhibitorbestimmung wird der zu untersuchende Urinextrakt gegen eine bekannte Dosis HCG bei weiblichen infantilen Mäusen getestet. GIA verhindert den stimulierenden Effekt des HCG am Mäuseuterus. (SOFFER 1961, 1962, 1963, 1964; LANDAU 1965, SAITO 1965, HIPKIN 1967, WEISER 1968)
Auch am Rattenuterus verhindert GIA eine Gewichtszunahme nach HCG-injektion.
Weiterhin kann man GIA am ventralen Prostatalappen infantiler Ratten testen. Dabei ist ohne Bedeutung, ob die Ratten vor dem Versuch hypophysektomiert

wurden oder nicht. (FUTTERWEIT 1963)
Durch Bestimmung der Mitoserate in den Samenblasen infantiler Ratten ist die Gonadotropin-Inhibitor-Wirkung von Urinextrakten ebenfalls nachweisbar. (PALAS 1967)
Durch HCG-Injektionen lassen sich bei weiblichen infantilen Mäusen Ovulationen auslösen. Injiziert man GIA zusammen mit dem HCG, so läßt sich in den Tuben eine deutliche Abnahme der Ei-Zahl feststellen. (OTA 1968)
SCHNEIDER (1968)konnte an ovariektomierten Ratten nachweisen, daß Urinextrakt von Kindern den LH-Gehalt und die LH-Abgabe der Hypophyse verringert.
DAVIS und Mitarbeiter (1966) fanden auf Grund von Tierversuchen noch andere Wirkungen des Urinextraktes, die sich nicht an den Gonaden abspielen: er hemmt die mitotische Aktivität der Mäuseepidermis und das Leberregenerationsvermögen nach partieller Hepatektomie.
DAVIS ist nach diesen Beobachtungen nicht der Ansicht, daß diese Substanzen im Urin nur die Gonadotropinaktivität inhibieren. Er hält es auch nicht für wahrscheinlich, daß diese Faktoren in der Kontrolle der Ovarialfunktion eine Rolle spielen.

Andere Autoren lehnen eine gonadotropininhibierende Substanz im Urin, von Kindern wie von Erwachsenen, völlig ab. Einerseits blieben ihre Versuche, GIA im Urin nachzuweisen, erfolglos, (HAHN 1965, ROSEMBERG 1965), andererseits führen sie eine Hemmung der Uterusgewichtszunahme nach HCG-Gabe bei SOFFER usw. auf eine toxische Wirkung des

Extraktes zurück.
Die Frage nach der Toxicität des Extraktes wird von allen Forschern aufgeworfen, und konnte bisher eigentlich noch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.
Zwar zeigen die Versuchstiere, verglichen mit den Kontrolltieren eine geringere Gewichtszunahme, aber auf Grund der Tatsache, daß der Urinextrakt nur LH (HCG) und nicht FSH (HMG) hemmt, (SOFFER 1964, LANDAU 1965), und die Wirkung von Östrogen (SOFFER 1961) und Testosteron (FUTTERWEIT 1963) nicht beeinflußt, läßt doch an einen spezifischen LH-Inhibitor denken, und schließt eine nur durch Toxicität hervorgerufene Hemmung wahrscheinlich aus.

SOFFER (1966) sieht vielmehr in der Extraktionsmethode die Ursache für den Mißerfolg im GIA-Nachweis bei manchen Forschern.

7. Unterschiedliche Gonadotropin- bzw. Gonadotropin-Inhibitor-Ausbeute bei verschiedenen Extraktionsmethoden:

HIPKIN (1967) verglich die Gonadotropinextraktionsmethoden von ALBERT (A-Methode) und LORAINE und BROWN (L-B-Methode) in Hinsicht auf ihre Gonadotropin- bzw. Gonadotropin-Inhibitor-Ausbeute: mengenmäßig erhält man bei der L-B-Methode 2-3 mal soviel Extrakt als bei der A-Methode; doch findet man in Hinsicht der Gonadotropinaktivität bei höheren Konzentrationen beim A-Extrakt 2,25 mal höhere Werte als beim L-B-Extrakt.

Bei niederen Konzentrationen besteht kein Unterschied.
Was den Gonadotropin-Inhibitor anbetrifft, so zeigt sich im L-B-Extrakt in höheren Konzentrationen eine 3,5 mal größere Wirksamkeit als beim A-Extrakt.
Somit konnte HIPKIN beweisen, daß die Extraktionsmethode nach ALBERT zwar zur Gonadotropinbestimmung gut geeignet ist, nicht aber zur GIA-Bestimmung.

Tatsächlich verwandten gerade die Forscher, die GIA nicht nachweisen konnten, (HAHN, ROSENBERG 1963), die Extraktionsmethode nach ALBERT.

8. Fragestellung:

Der vorliegenden Arbeit liegen folgende Fragen zugrunde:

a) läßt sich GIA im Urin von Kindern nachweisen, was eine Ursache für die geringe Gonadotropinausscheidung im Kindesalter wäre;

b) wie ändert sich die GIA-Ausscheidung bis zur Pubertät, und steht sie mit dem Anstieg der Gonadotropin-Ausscheidung zur Zeit der Pubertät im Zusammenhang;

c) wirkt GIA auch in vitro;d.h. wird HCG auch bei Incubation mit GIA gehemmt;

d) wirkt GIA immunologisch, bzw. hat es einen Einfluß auf den Pregnosticon^{R}- Test;

e) über welchen Mechanismus wird HCG durch GIA gehemmt: ist GIA eine Proteinase;dann wäre GIA durch Trasylol^{R} zu hemmen;
oder geht GIA mit HCG eine AG-AK-Reaktion ein; dann wäre eine immunologische Inaktivierung mit Imuran^{R} von Bedeutung;

f) läßt sich GIA mit Hilfe der Gelfiltration vom Gonadotropin oder den anderen Bestandteilen des Extraktes trennen?

II. Material und Methoden:

1. Material:

Es wurde Urin von gesunden Kindern im Alter von 3 - 14 Jahren verwendet. Der Urin wurde nach Geschlecht und Altersgruppen (3-5, 6-8, 9-11 und 12-14 Jahre) getrennt gesammelt. Jede Gruppe bestand aus 8 - 10 Kindern bei den 6 - 14-jährigen; bei den 3 - 5-jährigen waren es 40 bzw. 43 Kinder. Gerade von dieser Gruppe konnte aus technischen Gründen (Kindergarten) nur Tagesurin verwendet werden, während in den übrigen Gruppen Urin von Tag und Nacht gesammelt wurde.

2. HCG-Standard-Präparat:

Als HCG-Standard- bzw. Basis-Präparat wurde das Präparat PRIMOGONYL^{R} der Firma SCHERING AG BERLIN (1000I.E./2ml) verwendet.
Seine Aktivität soll durch GIA gehemmt werden.

3. Kaolin-Alkohol-Extraktionsmethode nach BRADBURY, BROWN and BROWN:

beschrieben von SAITO (1965) und SOFFER (1966)
Der Urin wurde sofort nach der Beschaffung nach einer Methode aufgearbeitet, wie sie zur Gonadotropinbestimmung üblich ist:

Je 2 l des Harnes wurden mit Eisessig auf ein pH von 5 gebracht. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit einem Meßgerät der Firma Metram AG, Herisau, Typ E 300.
Den 2 l angesäuerten Urins wurden 25 g trockenes Kaolin (Riedel de Haen feinst) zugegeben und 10 Minuten lang mechanisch gerührt. Das Kaolin-Urin-Gemisch wurde bis zum nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Abschütten des überstehenden Harnes wurde die Kaolin-Fällung 2 mal mit Wasser durchgespült und nach jedem Spülen zentrifugiert.
Mit 2 mal 25 ml einer 1 n-Ammoniumhydroxydlösung (= 10 Teile 25%ige NH_3-Lösung und 60 Teile destilliertes Wasser) wurde die Kaolin-Fällung extrahiert und zentrifugiert.
Das Eluat wurde wieder mit Eisessig auf pH 8,5 eingestellt. Nach dem Zentrifugieren wurde dieses Eluat auf pH 5 gebracht.
Die Fällung von Gonadotropin bzw. GIA erfolgte mit der 4-fachen Menge absoluten Alkohols.
Das Ammonium-Alkohol-Eluat wurde 48 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.
Nach dem Zentrifugieren wurde die Fällung = Urinextrakt über P_2O_5 im Exsiccator getrocknet und dannpulverisiert.
Das Trockenpulver wurde zum biologischen Test im physiologischer Kochsalzlösung gelöst.
Es wurden Lösungen von 300, 200, 100 und 50 ml Urinäquivalenten hergestellt.
Zur GIA-Bestimmung mußten die Lösungen 1 Stunde im Wasserbad bei 100°C gekocht werden, um die Gonadotropine zu zerstören.

4. Mäuse-Uterus-Test:

Zur Bestimmung der Gonadotropin- bzw. Gonadotropin-Inhibitor-Aktivität wurde die Uterusgewichts-

methode bei der infantilen weiblichen Maus gewählt. (KLINEFELTER 1943)
Verwendung fanden infantile, weibliche Mäuse des Inzuchtstammes MNRI der Firma S. IVANOVAS, Kissl egg/Allgäu mit einem Gewicht von 8 - 10 Gramm.

Bei diser Methode wird die Mäuseuterusgewichtszunahme auf Gonadotropingabe bestimmt: zur Gonadotropinbestimmung im Kinderharn wurde je 5 Mäusen der ungekochte Urinextrakt in Konzentrationen von 300 und 200 ml Urinäquivalenten/ml an 3 aufeinanderfolgenden Tagen in 5 Einzeldosen zu je 0,2 ml subcutan injiziert.

Das Prinzip der GIA-Bestimmung besteht darin, daß der gekochte Urinextrakt in verschiedenen Konzentrationen am Mäuseuterus bei konstanter HCG-Stimulierung getestet wird.
Bei Anwesenheit von GIA zeigt sich, daß die Uterusgewichtszunahme nicht der verabreichten HCG-Menge entspricht, sondern darunter liegt.
Der Nachweis von GIA wurde bei den angeführten 4 Altersgruppen nach Gruppe, Geschlecht und Extraktkonzentration getrennt an je 6 - 10 Mäusen durchgeführt:

Der gekochte Urinextrakt wurde in einer Dosis von insgesamt 300, 200, 100 und 50 ml Urinäquivalenten gegen je 0,6 I.E. HCG getestet.
Extrakt und HCG wurden jeweils in 5 Einzeldosen zu je 0,2 ml an 3 aufeinanderfolgenden Tagen getrennt, d.h. auf verschiedenen Seiten subcutan injiziert.
Eine Gruppe von Mäusen, die Kontrolltiere, erhielt nur 0,6 I.E. HCG.
18 - 20 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere mit Dichlormethan

getötet und Körper- und Uterusgewicht bestimmt. Das Uterusgewicht wurde mit einer Torsionswaage mit einer Meßgenauigkeit von 0,5 mg bestimmt.

5. Immunologischer GIA-Nachweis mit dem Pregnosticon^{R}- Test:

Der Pregnosticon^{R}- Test ist die Hämagglutinationshemmungsmethode zum immunologischen HCG-Nachweis. Der Test wurde nach der üblichen Gebrauchsanweisung von ORGANON durchgeführt.

6. Gelfiltration mit Sephadex G-100:

6 l Urin von Knaben im Alter von 6 - 8 Jahren wurden nach der Methode von BRADBURY, BROWN and BROWN aufgearbeitet. Der ungekochte Extrakt wurde in destilliertem Wasser aufgeschwemmt. Trockenes Sephadex G-100 wurde ebenfalls in destilliertem Wasser suspendiert und gewaschen.
Danach wurden Extrakt und Sephadex-Gel in Säulen von 40x3 cm gebracht.
Bei den erhaltenen Fraktionen wurde die UV-Absorption bei 280 mμ spektrometrisch bestimmt.

Die Substanzen der einzelnen Fraktionen wurden im Tierversuch auf Gonadotropin- bzw. Gonadotropin-Inhibitor-Aktivität getestet.

7. statistische Auswertung:

Die Auswertung der Versuchsergebnisse beruht auf dem Vergleich des Uterusgewichts der Versuchstiere, die 0,6 I.E. HCG und GIA in verschiedenen Konzentrationen erhielten, mit dem der Kontrolltiere, die nur 0,6 I.E. HCG erhielten. Aus den Uterusgewichtsunterschieden wurde an Hand der HCG-Standard-Kurve die prozentuale Hemmung errechnet.
Ferner wurden die Ergebnisse bei verschiedenen Extraktkonzentrationen und verschiedenen Altersgruppen untereinander verglichen.

Die Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten wurde nach folgenden Formeln durchgeführt:

a) Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} E_{xN}$$

b) Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \left(E\, x_n^2 - \frac{1}{N} E\, x_N \right)^2}$$

c) Variationskoeffizient:

$$v = \frac{100\ s}{\bar{x}}$$

Der mittlere Fehler des Mittelwertes wurde berechnet nach der Formel:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

dabei bedeutet x den jeweiligen Einzelwert des Uterusgewichts, $\bar{x}$ das arithmetische Mittel der Einzelwerte und N die Anzahl der zur Bildung des Mittelwertes benutzten Einzelwerte.

Zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen wurde zunächst mit dem F-Test auf homogene oder heterogene Varianzen ($=s^2$) untersucht. (Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, Tabelle Seite 40)

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

s = Standardabweichung

bei homogenen Varianzen:
Prüfquotient und Freiheitsgrad wurden folgendermaßen bestimmt:

$$s_v = \sqrt{\frac{s_1^2 (N_1-1) + s_2^2 (N_2-1)}{N_1 + N_2 - 2}}$$

$$s_{vd} = s_v \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$$

$$\text{Prüfquotient} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{vd}}$$

$$\text{Freiheitsgrad } (v) = N_1 + N_2 - 2$$

bei heterogenen Varianzen:

$$s_{vd} = \sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}$$

$$\text{Freiheitsgrad } (v) = \frac{1}{\frac{k^2}{v_1} + \frac{(1-k)^2}{v_2}}$$

$$v_1 = N_1 - 1$$

$$k = \frac{N_2 \cdot s_1^2}{N_2 \cdot s_1^2 + N_1 \cdot s_2^2}$$

$$\text{Prüfquotient} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{vd}}$$

Für den errechneten Prüfquotienten und Freiheitsgrad wurde P als Maß für die Signifikanz des Unterschieds zwischen den Mittelwerten der beiden Versuchsgruppen aus der Tabelle S.32 der Wissenschaftlichen Tabellen, Documenta Geigy abgelesen.
Ist $P < 0{,}05$, so kann der Unterschied zwischen den Mittelwerten als "signifikant" betrachtet werden; d.h. der Unterschied ist zu 95 % gesichert.

III. Ergebnisse:

Auf Grund der Untersuchungen von HIPKIN (1967) (geringere GIA-Ausbeute bei der Methode von Albert) und der Tatsache, daß einige Forscher GIA mit der Methode nach Albert nicht nachweisen konnten, wurde in den vorliegenden Versuchen die Methode nach Bradbury, Brown and Brown zum Nachweis von GIA im Kinderharn verwendet.

1. HCG-Standard-Kurve:

Das Präparat PRIMOGONYL^{R} wurde je 10 Mäusen in Konzentrationen von insgesamt 0,3 - 1,0 I.E. HCG je Maus subcutan injiziert.

Bei logarithmischer Auftragung der erhaltenen Uterusgewichtswerte ergab sich eine Gerade.

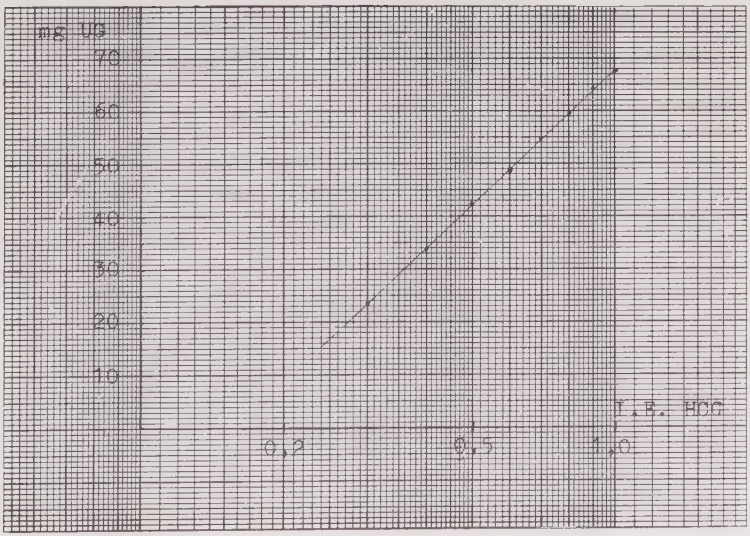
s. Tab. 1 und Abb.1

In Tab. 1 ist das Uterusgewicht und der mittlere Fehler des Mittelwertes bei unterschiedlicher HCG-Stimulierung aufgeführt.
Abb. 1 zeigt die graphische Darstellung von Tab. 1.

Tabelle 1:

I.E. HCG	Uterusgewicht (mg) $\pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$
0,3	23,37 ± 5,03
0,4	33,62 ± 1,99
0,5	42,50 ± 2,84
0,6	48,66 ± 5,97
0,7	54,15 ± 6,21
0,8	61,15 ± 5,42
0,9	64,75 ±11,50
1,0	67,60 ± 7,32

Abbildung 1:



2. Gonadotropin-Bestimmung:

Der ungekochte Urinextrakt aller 4 Altersgruppen wurde in absteigenden Konzentrationen im Tierversuch getestet:
Der Mäuseuterus zeigte in keiner Konzentration und in keiner Altersgruppe eine Gewichtszunahme; d.h.: es war keine gonadotrope Aktivität nachweisbar.

3. GIA-Bestimmung:

in vivo:
Der gekochte Urinextrakt wurde, nach Alter, Geschlecht und Konzentration getrennt, gegen 0,6 I.E. HCG getestet:
Da sich in den Ergebnissen keinerlei Unterschied ergab zwischen dem Extrakt aus Knaben- und Mädchenharn, wurden die Einzelwerte beider Geschlechter zu e i n e m Mittelwert zusammengefaßt.

In Tab. 2 ist der Mittelwert des Uterusgewichts, der mittlere Fehler des Mittelwerts und die HCG-Hemmung in Prozent bei den verschiedenen Altersgruppen und Extraktkonzentrationen eingetragen.

Im Urinextrakt aller Altersgruppen konnte GIA nachgewiesen werden. Die HCG-hemmende Wirkung nimmt mit fallenden Extraktkonzentrationen ab. Der Uterusgewichtsunterschied bei den einzelnen Extraktkonzentrationen ist jeweils signifikant.

Tabelle 2: der gekochte Urinextrakt der einzelnen Altersgruppen wurde in verschiedenen Konzentrationen gegen 0,6 I.E. HCG getestet.

Alter (J)	Extr.-Konz.i. ml Ur.-Äqu.	Zahl d. Tiere (n)	Körpergewicht (g)	Uterusgew.(mg) $\pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$	Var.-Koeff. $v = \frac{100\ s}{\bar{x}}$	Hemmung %
3 - 5	300	7	11,2	15,57 ± 0,67	11,36	60,0
	200	9	11,1	25,50 ± 2,39	28,10	48,6
	100	9	12,4	30,72 ± 1,87	18,29	38,2
	50	8	11,8	42,69 ± 1,80	11,93	15,0
6 - 8	300	11	9,1	17,50 ± 2,04	38,73	55,5
	200	13	10,0	23,73 ± 1,94	29,48	50,0
	100	10	11,0	30,30 ± 3,01	31,44	37,6
	50	12	11,0	43,20 ± 3,37	27,00	13,4
9 - 11	300	14	9,8	18,57 ± 1,89	38,14	55,6
	200	12	9,9	23,25 ± 1,22	18,24	50,0
	100	10	9,1	27,25 ± 2,60	30,34	43,4
	50	14	11,5	40,75 ± 1,88	17,28	20,0
12 - 14	300	13	11,2	19,73 ± 1,08	19,79	53,2
	200	13	10,4	24,38 ± 0,96	14,33	48,5
	100	18	10,7	38,25 ± 2.07	22,94	23,4
Kontrolle	0,6 I.E. HCG	50	10,5	47,58 ± 2,38	35,44	-

Tabelle 3: der gekochte Urinextrakt wurde vor der Injektion 24 Stunden zusammen mit 0,6 I.E. HCG incubiert.

Alter (J)	Extr.-Konz.i. ml Ur.-Äqu.	Zahl d. Tiere (n)	Körpergewicht (g)	Uterusgew.(mg) $\pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$	Var.-Koeff. $v = \frac{100\ s}{\bar{x}}$	Hemmung %
3 - 5	300	7	11,2	17,07 ± 0,88	13,68	56,5
	200	14	11,3	23,25 ± 1,18	19,00	49,5
	100	10	11,3	25,65 ± 1,88	23,17	44,6
	50	7	10,5	43,00 ± 0,38	2,32	14,5
6 - 8	300	14	10,5	19,64 ± 0,64	12,29	55,5
	200	15	11,0	22,77 ± 1,21	21,80	50,0
	100	12	10,5	29,79 ± 2,18	25,34	40,6
	50	16	11,0	45,59 ± 1,96	17,18	6,0
9 - 11	300	16	10,2	23,03 ± 1,42	24,76	50,0
	200	16	10,2	25,66 ± 0,90	14,08	46,6
	100	12	9,8	30,17 ± 2,26	24,92	39,2
	50	15	10,8	43,16 ± 1,64	14,77	15,0
12 - 44	300	16	10,4	22,28 ± 1,30	23,43	51,0
	200	14	11,7	25,46 ± 1,45	21,38	46,7
	100	20	10,7	41,30 ± 3,28	25,76	18,4
Kontrolle	0,6 I.E. HCG	50	10,5	47,58 ± 2,38	35,44	-

In den verschiedenen Altersgruppen zeigte sich in den Konzentrationen 300 und 200 ml Urinäquivalenten kein signifikanter Unterschied in der GIA-Ausscheidung. Auch bei einer Konzentration von 100 ml Urinäquivalenten konnten in den Altersgruppen 3 - 5, 6 - 8 und 9 - 11 Jahre keine Unterschiede in der inhibitorischen Wirkung des Extraktes festgestellt werden. Doch bei 12 - 14-jährigen Kindern war gerade bei dieser Extraktkonzentration eine signifikante Abnahme der HCG-hemmenden Wirkung zu sehen.

s. Tab. 2

in vitro:
Zum Nachweis einer In-Vitro-Reaktion zwischen GIA und HCG wurde der gekochte Extrakt zusammen mit der entsprechenden HCG-Menge 24 Stunden bei 20°C incubiert. Anschließend wurde der biologische Test nach der üblichen Art an Mäusen durchgeführt.
Auch hier war wieder in allen Altersgruppen und Konzentrationen eine HCG-Hemmung nachzuweisen. Die Uterusgewichtsunterschiede bei den einzelnen Konzentrationen sind signifikant und gleichsinnig wie bei den In-Vivo-Versuchen.
Hier war ebenfalls zwischen den Gruppen 3 - 5, 6 - 8 und 9 - 11 Jahren kein signifikanter Unterschied in der GIA-Ausscheidung in Abhängigkeit vom Alter festzustellen.

Doch bei den 12 - 14-jährigen Kindern fand sich in dieser Versuchsreihe bereits bei einer Extraktkonzentration von 300 ml Urinäquivalenten eine signifikante Abnahme der HCG-inhibierenden Wirkung des Urinextraktes, verglichen mit dem Extrakt von 3 - 5-jährigen Kindern.
Die Unterschiede in den Versuchsergebnissen bei diesen beiden Altersgruppen waren auch in den Extraktkonzentrationen von 100 ml Urinäquivalenten signifikant, nicht jedoch bei einer Extraktkonzentration aus 200 ml Harn.

s. Tab. 3

immunologisch:
Der immunologische GIA-Nachweis wurde mit dem Pregnosticon-Test durchgeführt, bei einer Extraktkonzentration von 300 ml Urinäquivalenten und 0,1 I.E. HCG.
Zur Kontrolle wurde der Test einerseits allein mit 0,1 I.E. HCG, andererseits allein mit dem Extrakt ausgeführt.
Bei den Kontrollversuchen allein mit HCG fiel der Test immer positiv aus;doch auch bei den Kontrollversuchen allein mit dem gekochten Extrakt war er durchwegs positiv mit Ausnahme des Extraktes aus Urin von 9 - 11-jährigen Knaben.

Wenn man aus der Größe des Ringes der abgesetzten Erythrocyten im Pregnosticon-Test Rückschlüsse auf die Stärke des Testes schließen kann, (APOSTOLAKIS 1957) so muß man sagen, daß mit

Ausnahme des Versuchs mit Extrakt aus Urin von 6 - 8- und 12 - 14-jährigen Mädchen, der Test bei Verwendung von Extrakt + HCG immer verstärkt wurde, im Vergleich zum Kontrollversuch allein mit HCG;d-h.: die Erythrocyten setzten sich in einem kleineren Ring ab.

In einem weitern Versuch wurde 0,1 I.E. HCG zusammen mit einem Extrakt aus 300 ml Urin 24 Stunden incubiert: doch auch hier fand sich eine deutliche Verstärkung gegenüber der Kontrolle.

4. Beeinflussung von GIA durch TRASYLOL^{R}:
(BAYER - LEVERKUSEN, 100 000 KIE/10 ml)

Aus der Vorstellung heraus, GIA ist eine Proteinase und inaktiviert HCG durch proteolytischen Abbau, wurde der Versuch unternommen, die proteolytische Wirkung von GIA mit Trasylol zu hemmen.
Trasylol ist ein polyvalenter Proteinasen-Inhibitor und wird aus tierischen Organen gewonnen.
Es hemmt die polyvalenten proteolytischen Wirkungen des Plasmas. Der Wirkstoff des Trasylol ist ein basisches Polypeptid, das 16 verschiedene Aminosäuren in einer Kette enthält. (HELWEG 1967)

500 KIE Trasylol/Tier wurden zusammen mit GIA gegen 0,6 I.E. HCG getestet.
GIA und Trasylol wurden erst unmittelbar vor der Injektion zusammengebracht.

s. Tab. 4

Es zeigte sich durchgehend eine HCG-inhibierende Wirkung, die sich von der ohne Trasylol-Zusatz nicht unterschied. Bei allen Versuchsgruppen war eine Hemmung mit signifikanten, konzentrationsabhängigen Unterschieden nachzuweisen.
Die Altersabhängigkeit der GIA-Ausscheidung zeigte sich auch hier wieder in der Gruppe der 12 - 14-jährigen Kinder. Die geringere HCG-Hemmung des Extraktes aus Urin dieser Kinder, verglichen mit der aus Urin der übrigen Altersgruppen, wurde jedoch wieder erst bei einer Extraktkonzentration aus 100 ml Harn signifikant.

5. Beeinflussung von GIA durch Imuran^{R}:
(C.T. 1424, the wellcome building,
Easton Road, LONDON, N.W.1)

GIA wirkt im Tierversuch ebenso wie Antiseren zu hypophysären Gonadotropinen. (HAYASHIDA 1963, ANDREOLI 1962, PIGON 1960, WOLF 1963, BOURDEL 1963, TAYMOR 1965, WILDE 1965, WEISER 1968)
Diese Tatsache läßt vermuten, daß die HCG-Inaktivierung auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen GIA und HCG beruht.
Man versuchte nun, diese Reaktion mit einer immunsuppressiven Substanz, dem Imuran (Azathioprin), zu unterdrücken.
Imuran ist ein Derivat des 6-Merkaptopurin.
Imuran wurde in einer Dosis von insgesamt 0,5 mg/Maus zusammen mit GIA injiziert.

Tabelle 4: der gekochte Urinextrakt wurde in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit 500 KIE Trasylol /Maus gegen 0,6 I.E. HCG getestet.

Alter (J)	Extr.-Konz.i. ml Ur.-Äqu.	Zahl d. Tiere (n)	Körpergewicht (g)	Uterusgew.(mg) $\pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$	Var.-Koeff. $v = \frac{100\ s}{\bar{x}}$	Hemmung %
3 - 5	300	7	10,9	14,64 ± 1,78	32,26	60,0
	200	15	11,2	23,43 ± 1,34	22,23	50,8
	100	10	11,4	26,00 ± 0,96	11,64	45,7
	50	8	11,5	42,12 ± 2,02	13,50	16,6
6 - 8	300	14	10,4	20,57 ± 0,95	17,33	53,6
	200	16	10,8	25,28 ± 1,27	20,12	46,6
	100	12	10,5	28,54 ± 2,32	28,15	42,0
	50	18	10,9	44,75 ± 1,72	16,34	14,6
9 - 11	300	15	9,9	18,77 ± 1,22	25,21	55,0
	200	16	9,7	20,75 ± 1,00	19,31	52,5
	100	12	10,0	29,71 ± 1,15	12,79	40,4
	50	16	10,0	43,19 ± 1,60	16,30	14,6
12 - 14	300	16	10,2	19,34 ± 1,23	25,51	54,8
	200	16	10,4	27,09 ± 1,14	16,85	43,2
	100	20	10,3	38,27 ± 1,49	17,37	24,5
Kontrolle	0,6 I.E. HCG	50	10,5	47,58 ± 2,38	35,44	-

Tabelle 5: der gekochte Urinextrakt wurde in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit 0,5 mg Imuran/Maus gegen 0,6 I.E. HCG getestet.

Alter (J)	Extr.-Konz.i. ml Ur.-Äqu.	Zahl d. Tiere (n)	Körpergewicht (g)	Uterusgew.(mg) $\pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$	Var.-Koeff. $v = \frac{100\ s}{\bar{x}}$	Hemmung %
3 - 5	300	7	11,1	16,33 ± 1,25	20,32	57,4
	200	15	10,4	20,00 ± 1,63	31,71	53,3
	100	10	11,9	27,05 ± 1,40	16,38	42,5
	50	8	11,6	43,31 ± 2,19	14,32	13,4
6 - 8	300	15	10,2	20,27 ± 1,55	29,46	53,0
	200	16	11,1	25,00 ± 1,45	23,27	47,0
	100	12	11,2	31,37 ± 2,09	23,17	36,5
	50	17	11,6	45,97 ± 1,36	12,26	5,5
9 - 11	300	15	10,4	20,60 ± 0,86	16,10	52,5
	200	15	10,4	23,00 ± 1,58	26,71	49,7
	100	12	10,2	30,46 ± 1,46	17,31	38,0
	50	15	10,6	43,00 ± 1,21	10,96	14,7
12 - 14	300	15	10,1	22,10 ± 1,58	27,74	50,8
	200	16	10,6	26,16 ± 1,87	28,68	45,0
	100	19	10,8	34,94 ± 1,40	15,31	20,5
Kontrolle	0,6 I.E. HCG	50	10,5	47,58 ± 2,38	35,44	-

s. Tab. 5

GIA konnte mit Imuran nicht gehemmt werden.
Die Wirkung von GIA auf HCG blieb in allen Versuchsreihen unbeeinflußt.
Auch hier bestand ein signifikanter Unterschied in der HCG-Hemmung in Abhängigkeit von der Extraktkonzentration. Der Uterusgewichtsunterschied in Abhängigkeit vom Alter war wiederum erst in der Gruppe der 12 - 14-jährigen Kinder signifikant.

6. Gelfiltration mit Sephadex G-100:

Es wurde bereits von einigen Forschern der Versuch unternommen, GIA durch Gelfiltration vom Gonadotropin im Urinextrakt zu trennen, (SAITO 1965, DAVIS 1966, HIPKIN 1967), oder GIA in einer Fraktion zu konzentrieren.
Der Extrakt aus 6 l Urin von 6 - 8-jährigen Knaben wurde durch Gelfiltration mit Sephadex G-100 zu trennen versucht[1)].
Die UV-Absorption bei 280 mμ ergab keine scharfe Trennung der Proteine.
Die erhaltenen 4 Fraktionen wurden getrennt auf Gonadotropinaktivität und GIA getestet.
Zum GIA-Nachweis wurde der Extrakt 1 Stunde bei 100°C im Wasserbad gekocht.
Der Test wurde in jeder Fraktion mit Extraktkonzentrationen von 300, 200 und 100 ml Urinäquivalenten in Gruppen von je 5 Mäusen durchgeführt.

1) Herrn Dr. Ströbel vielen Dank für die Aufarbeitung des Extraktes.

Es konnte in keiner der 4 Fraktionen Gonadotropinaktivität nachgewiesen werden.
GIA jedoch war in allen 4 Fraktionen in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden.

s. Tab. 6

Auch hier nahm die GIA-Konzentration von 300 ml zu 100 ml Urinäquivalenten ab.
Doch auch in den einzelnen Fraktionen zeigten sich Unterschiede in der GIA-Konzentration: während die Fraktionen I und III in den höchsten Extraktkonzentrationen noch eine HCG-Hemmung zeigten, die etwa dem Rohextrakt entspricht, hat sie bei dieser Extraktkonzentration in Fraktion IV deutlich, noch mehr in Fraktion II abgenommen.
Die Unterschiede in der HCG-Hemmung zwischen den Fraktionen I und III und den Fraktionen II und IV bei einer Extraktkonzentration von 300 ml Urinäquivalenten sind signifikant.
Wie Tab. 6 zeigt, bestanden auch bei einem Extrakt von 100 ml Urinäquivalenten zwischen diesen Fraktionen Unterschiede in der HCG-Hemmung von ca 15%.
Doch konnte bei diesen Mittelwerten eine Signifikanz nicht nachgewiesen werden, d.h., der errechnete P-Wert ist größer als 0,05.
Doch vergleicht man die inhibitorische Wirkung des Rohextraktes bei dieser Konzentration (100 ml), mit der der einzelnen Fraktionen, so zeigte sich eine signifikante Verminderung der HCG-Hemmung in allen 4 Fraktionen, was wahrscheinlich auf den Verdünnungseffekt zurückzuführen ist.

Tabelle 6: der Urinextrakt von 6 - 8-jährigen Knaben wurde an Sephadex G-100 gelfiltriert; die erhaltenen 4 Fraktionen wurden einzeln in verschiedenen Konzentrationen gegen 0,6 I.E. HCG getestet.

Fraktion	0,6 I.E. HCG + 300 ml		0,6 I.E. HCG + 200 ml		0,6 I.E. HCG + 100 ml	
	UG (mg)	Hemmung (%)	UG (mg)	Hemmung (%)	UG (mg)	Hemmung (%)
I	16,33 ± 3,94	57,0	27,75 ± 1,90	45,0	42,90 ± 2,32	15,0
II	36,60 ± 2,85	28,4	43,50 ± 0,96	13,4	48,50 ± 1,84	-
III	15,60 ± 1,39	58,3	30,30 ± 0,73	38,4	42,75 ± 2,47	15,0
IV	25,50 ± 1,60	44,0	34,20 ± 0,78	32,5	47,75 ± 3,51	3,2
Rohextrakt	18,10 ± 1,44	56,5	23,40 ± 1,83	50,0	31,30 ± 2,85	36,6

IV. Diskussion:

1. Gonadotropin-Ausscheidung bei Kindern im Alter von 3 - 14 Jahren:

In keinem der Urinextrakte konnte Gonadotropinaktivität nachgewiesen werden; merkwürdigerweise auch nicht bei den 12 - 14-jährigen.
Nach APOSTOLAKIS und VOIGT (1965) sind etwa 2,5 Jahre vor der Pubertät Gonadotropine im Harn nachweisbar; d.h. bei 12 - 14-jährigen Kindern sollten bereits Gonadotropine zu finden sein.
Doch da in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, daß die GIA-Konzentration auch noch in dieser Altersgruppe in hohen Extraktdosen hoch ist, können die Gonadotropine durch die zugleich im Extrakt vorhandene GIA gehemmt worden sein.
Sieht man von der Möglichkeit ab, daß die Gonadotropinkonzentration in den vorliegenden Versuchen unter der nachweisbaren Grenze liegt, so kann die hier verwandte Extraktionsmethode noch ein weiterer Grund dafür sein, daß der Gonadotropinnachweis negativ ausfiel: wie von HIPKIN (1967) gezeigt wurde, liegt die Gonadotropinausbeute bei der hier angewandten Methode nach Bradbury, Brown and Brown niedriger als bei der Methode nach Albert; der Grund hierfür kann wieder der zugleich extrahierte Inhibitor sein.

2. Konzentrationsabhängigkeit von GIA:

In allen Versuchen konnte GIA nachgewiesen werden: erwartungsgemäß nahm die HCG-inhibierende Wirkung des Extraktes mit abnehmender Extrakt-Konzentration ab. Trägt man die Werte logarithmisch auf, so ergibt sich eine Gerade.

Abbildung 2:

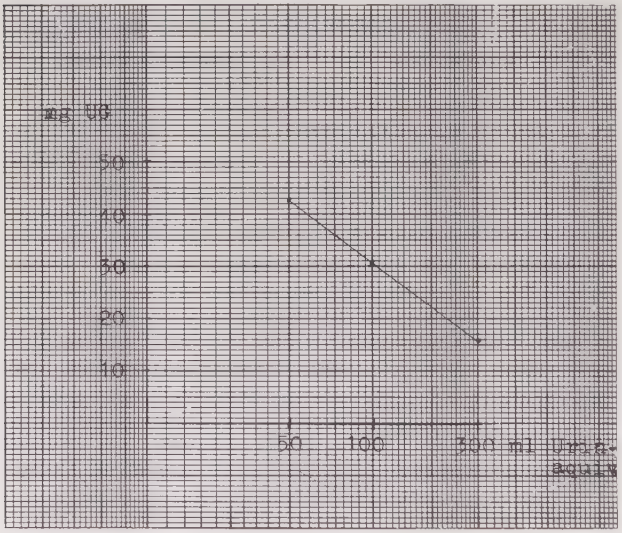


Abb. 2 zeigt die Ergebnisse des biologischen Tests, in dem Urinextrakt von 3 - 5-jährigen Kindern in verschiedenen Konzentrationen gegen 0,6 I.E. HCG getestet wurde.

3. Altersabhängigkeit von GIA:

In den Altersgruppen 3 -5, 6 - 8 und 9 - 11 Jahre konnten keine Altersunterschiede in der GIA - Ausscheidung festgestellt werden, weder in hoher , noch in niedriger Extraktkonzentration.
Eine Abnahme in der GIA - Ausscheidung bestand aber bei den 12 - 14-jährigen Kindern, der jedoch erst in einer Extraktkonzentration von 100 ml Urinäquivalenten deutlich wurde.

Abbildung 3:

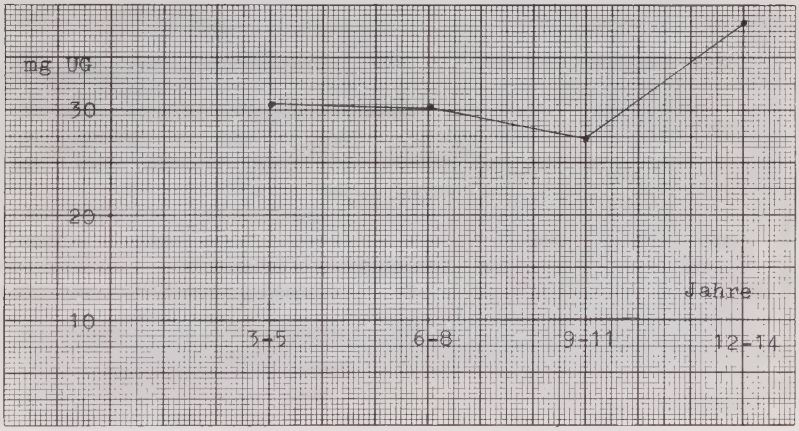


Abb. 3 zeigt die Ergebnisse des biologischen Tests, in dem Urinextrakt der einzelnen Altersgruppen in einer Konzentration von 100 ml Urinäquivalenten gegen 0,6 I.E. HCG getestet wurde.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Angaben in der Literatur über die Gonadotropinausscheidung beim Kind: die Gonadotropine nehmen zur Zeit der Pubertät zu. Die Ursache hierfür mag die abnehmende GIA-Konzentration sein. Umso wahrscheinlicher ist dies, da man weiß, daß der Quotient FSH/LH zwischen Kindheit und Erwachsenenalter von 5 auf 1 sinkt,d.h., daß die LH-Konzentration relativ mehr zunimmt, als die FSH-Konzentration, (RIFKIND 1967), und daß GIA eine spezifische Hemmwirkung auf LH ausübt, wie bereits hinreichend bewiesen werden konnte. (SOFFER 1965, LANDAU 1965, FUTTERWEIT 1963, OTA 1968) In der Literatur findet man keine Angaben über die Abnahme von GIA in oder vor der Pubertät. In allen Arbeiten zu diesem Thema ging es in erster Linie darum, die Existenz einer gonadotropininhibierenden Substanz zu beweisen;so hat man entweder den Extrakt nicht nach Altersgruppen getrennt untersucht (SAITO 1965), oder die Extraktkonzentrationen nicht geändert.

In den vorliegenden Versuchen wurde die GIA-Ausscheidung jeweils auf eine bestimmte Menge Harn bezogen.
Um eindeutige und in den verschiedenen Altersgruppen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müßte die GIA-Konzentration im 24-Stunden-Urin bestimmt werden.
Aus technischen Gründen (Kindergarten, Kinderheim) war jedoch das exakte Sammeln von 24-Stunden-Harn-Portionen nicht möglich.

Da aber die 24-Stunden-Urinmenge bei jüngeren Kindern geringer ist, als bei älteren, und da man in vorliegenden Untersuchungen in 300 ml Harn bei den 3-5jährigen dieselbe GIA-Konzentration nachweisen konnte wie bei den 12-14-jährigen, muß man bei den älteren Kindern wegen der größeren 24-Stunden-Urinmenge eine höhere GIA-Ausscheidung in 24 Stunden annehmen, als bei den jüngeren.

4. Vergleich der Ergebnisse des In-vivo und In-vitro-Testes:

Die Ergebnisse bei den Versuchen nach Extrakt-Incubation unterschieden sich nicht von denen des Extraktes ohne Incubation.

In Hinsicht auf Konzentrationsabhängigkeit ergaben sich beim In-vitro-Versuch keine Unterschiede zu dem In-vivo-Versuch.

Abbildung 4:

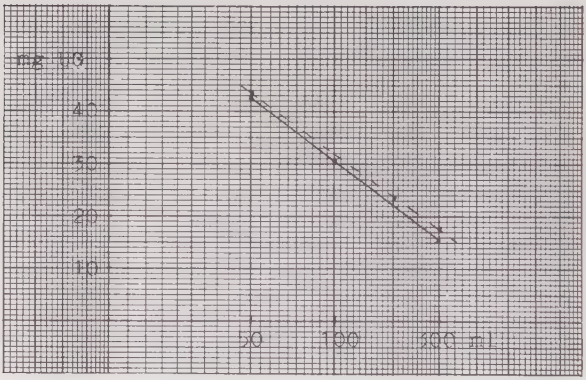


Abb. 4 zeigt die Ergebnisse der Versuche, bei denen Urinextrakt verschiedener Konzentrationen gegen 0,6 I.E. HCG getestet wurden.

——— in vivo: Extrakt und HCG getrennt injiziert.

- - - - in vitro: Extrakt zusammen mit HCG 24 Stunden incubiert.

Auch ergab sich in der Altersabhängigkeit der GIA-Ausscheidung bei beiden Versuchen kein Unterschied.

Abbildung 5:

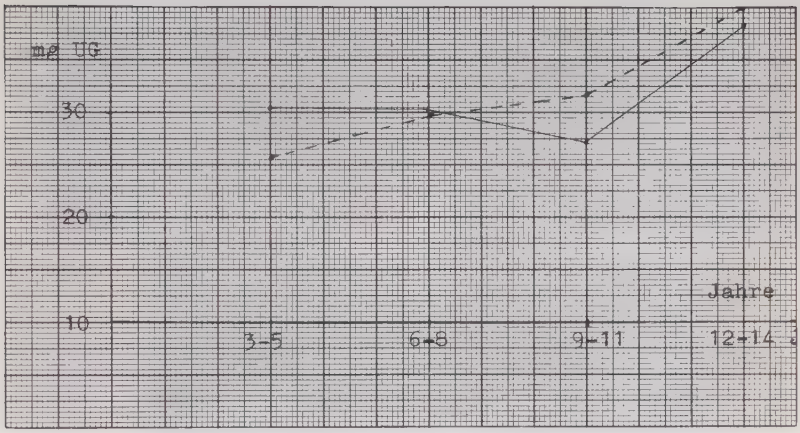


Abb. 5 zeigt die Ergebnisse der Versuche, in denen Urinextrakt der einzelnen Altersgruppen in einer Konzentration von 100 ml Urinäquivalenten in vivo und in vitro gegen 0,6 I.E. HCG getestet wurde.

Doch kann auf Grund dieses In-vitro-Testes nicht gesagt werden, ob GIA bereits während der Incubation mit HCG reagierte, oder ob die Inaktivierung von HCG erst nach der Injektion beim Tierversuch eintrat.

5. Vergleich der Ergebnisse bei Trasylol- und Imuran-Zusatz:

Aus diesen Versuchsergebnissen kann mit Sicherheit gesagt werden, daß GIA von den zugleich verabreichten 500 KIE Trasylol bzw. 0,5 mg Imuran nicht gehemmt wird; denn es zeigte sich wieder dieselbe Konzentrationsabhängigkeit und dieselbe Altersabhängigkeit wie bei den Versuchen ohne Trasylol bzw. Imuran.

Abbildung 6:

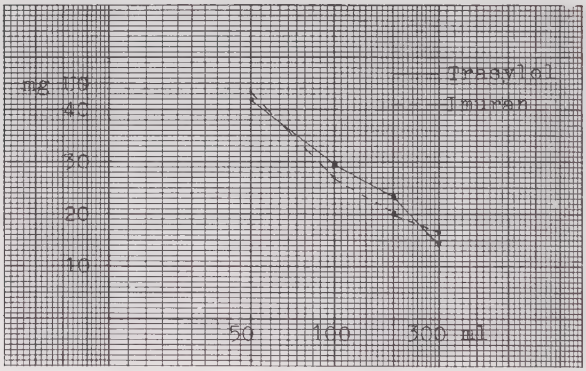


Abb. 6 zeigt die Ergebnisse der Versuche, in denen Urinextrakt verschiedener Konzentrationen zusammen mit Trasylol bzw. Imuran gegen 0,6 I.E. HCG getestet wurde.

Abbildung 7:

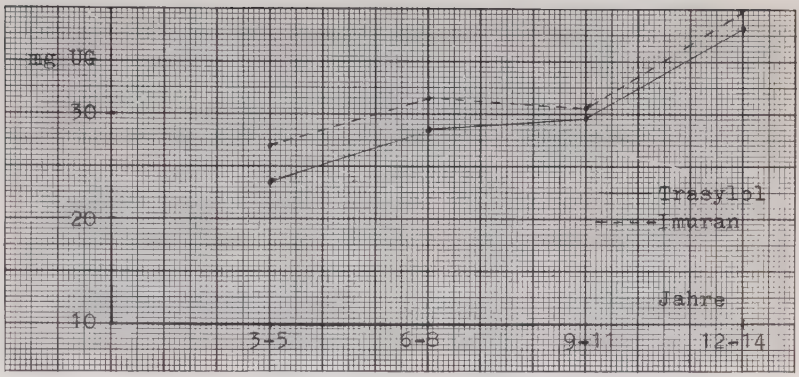


Abb. 7 zeigt die Ergebnisse der Versuche, in denen Urinextrakt er einzelnen Altersgruppen in einer konzentration vom 100 ml Urinäquivalenten zusammen mit Trasylol bzw. Imuran gegen 0,6 I.E. HCG getestet wurde.

Auf Grund diser Ergebnisse darf man also annehmen, daß GIA nicht eine Proteinase ist, die HCG durch proteolytische Spaltung unwirksam macht.
Ebenso gehen GIA und HCG keine AG-AK-Reaktion ein, die durch Imuran gehemmt werden könnte.
Natürlich besteht die Möglichkeit, daß Trasylol und Imuran in zu geringen Dosen verabreicht wurden, um die gonadotropininhibierende Wirkung des Extraktes zu unterdrücken. Doch sollte dies der Fall sein, so müßte zumindest in der geringsten Extraktkonzentration ein Unterschied in den Ergebnissen bestehen, verglichen mit denen ohne Trasylol bzw. Imuran.

6. Immunologischer Test:

Beim Pregnosticon-Test zeigte sich, mit einigen Ausnahmen, eine Verstärkung des Testes, im Gegensatz zur erwarteten Hemmung.
Da der Test ohne HCG-Zusatz bereits positiv ausfiel, ist es nicht wahrscheinlich, daß GIA mit HCG eine Reaktion eingeht und der Pregnosticon-Test dadurch verstärkt wird. GIA muß vielmehr immunologisch eine dem HCG ähnliche Wirkung haben: durch die Reaktion mit dem Kaninchenantiserum wird die Agglutination der HCG-sensibilisierten Hammelerythrocyten verhindert.
Auf Grund dieses Testes ist allerdings nicht zu sagen, ob dies eine Nebenreaktion des Urinextraktes ist, oder ob sie für den spezifischen HCG-Inhibitor charakteristisch ist.

7. Gelfiltration mit Sephadex G-100:

Eine Trennung des Gonadotropins von GIA gelang mit der Gelfiltration nicht.
Bei der chromatographischen Auftrennung des Urinextraktes mit Hilfe der Gelfiltration erhielt man 4 Fraktionen.
In allen 4 Fraktionen ist GIA enthalten, doch der Hauptgehalt ist in Fraktion I und III; d.h., man kann GIA nicht von den anderen Bestandteilen des Extraktes trennen. Dies besagt, daß die GIA-Moleküle in derselben Größenordnung liegen, wie die der anderen Bestandteile.
SAITO (1965), DAVIS (1966) und HIPKIN (1967) unternahmen bereits den Versuch, GIA mit Hilfe der Gelfiltration reindarzustellen, doch er

verlief immer ohne Erfolg: GIA war jeweils in allen Fraktionen nachzuweisen, sofern eine klare Trennung der Proteine gelang.
GIA könnte in verschiedenen Aggregationen als mono-, di- oder trimer vorliegen, wie das auch von HCG beschrieben ist. (BLOBEL, SCHUMACHER, UHLIG 1960)
Erstaunlich ist an diesem Versuch, daß GIA in den Fraktionen I und III noch in ebenso hohen Konzentrationen nachzuweisen ist, wie im Rohextrakt: wahrscheinlich steigt die HCG-inhibierende Wirkung, entsprechend der Gonadotropinaktivität, bis zu einem gewissen Wert an; eine weitere Steigerung der Wirkung ist dann trotz steigender Konzentration nicht mehr möglich.
Diese maximale Hemmung wäre also in vorliegenden Untersuchungen bei einer Extrakt-Konzentration von 300 ml Urinäquivalenten erreicht.

8. Toxische Wirkung des Extraktes:

In vorliegenden Versuchen zeigte sich zwar eine gewisse Toxicität des Extraktes, aber sie war nicht so ausgeprägt, daß die Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren einen wesentlichen Unterschied in der Gewichtszunahme aufwiesen.

Die Versuchstiere zeigten nur in der Konzentration von 300 ml Urinäquivalenten Krankheitserscheinungen, wie struppiges Fell, niedrigere Körpertemperatur und Durchfall. Diese Zeichen waren nach der 3. Injektion am meisten ausgeprägt. Danach erholten sich die Tiere wieder nahezu völlig bis zur Tötung.
Nur ca 1 - 2% der Mäuse starben während des Versuches.

Auf Grund dieser Beobachtungen kann also nicht gesagt werden, daß allein die Toxicität des Extraktes die HCG-Hemmung bewirkte, was von einigen Forschern so sehr in den Vordergrund gestellt wurde, (ROSENBERG 1965, HAHN 1965), sondern es ist wahrscheinlich , daß die Hemmung von HCG durch eine spezifische Substanz verursacht wurde, die im Kinderharn enthalten ist.
Würde man auch bei rein toxischer Wirkung eine Konzentrationsabhängigkeit erkennen, doch eine Altersabhängigkeit wäre sicher ausgeschlossen. Hinzu kommen noch die Beweise von SOFFER, ROSENBERG usw., daß GIA nur LH, nicht aber FSH, Östrogen oder Testosteron hemmt; sie schließen eine ausschließliche Toxicität des Extraktes ebenfalls aus.

V. Zusammenfassung:

In dieser Arbeit konnte eine gonadotropininhibierende Substanz im Harn von 3-14-jährigen Kindern mit dem Mäuse-Uterus-Test nachgewiesen werden. Sie war im Urin bei den Altersgruppen von 3-5, 6-8, 9-11 und 12-14 Jahren und im Extrakt aus 300, 200, 100 und 50 ml Harn enthalten.
Mit fallender Extraktkonzentration sank die gonadotropininhibierende Aktivität. Bei einer Extraktkonzentration von 300 ml Urinäquivalenten schien die GIA-Konzentration bei Kindern im Alter von 3-11 Jahren konstant zu sein, während sie bei den 12-14-jährigen abnahm, was sich in der Extraktkonzentration von 100 ml Urinäquivalenten deutlicher zeigte. Durch diesen GIA-Abfall wäre das Ansteigen der Gonadotropin- bzw. LH-Aktivität zur Zeit der Pubertät zu erklären. Ein Ansteigen der Gonadotropinausscheidung in diesem Alter konnte in vorliegenden Versuchen nicht nachgewiesen werden.

Die gonadotropininhibierende Substanz im Urinextrakt wurde durch absoluten Alkohol oder durch Kochen bei 100°C nicht inaktiviert.
Ferner konnte sie weder durch Trasylol^{R} noch durch Imuran^{R} beeinflußt werden.
Mit Sephadex G-100 war GIA nicht vom Gonadotropin zu trennen und war in allen 4 Fraktionen noch nachweisbar.
GIA hatte zwar Einfluß auf den Pregnosticon-Test, doch können daraus keine eindeutigen Rückschlüsse

auf Eigenschaften und Wirkungsweise dieser Substanz gezogen werden.
Auf Grund dieser Arbeit kann also nur gesagt werden, daß GIA existiert.
Die Versuche erlauben jedoch keinerlei Aussagen über chemischen Aufbau oder Reaktionsweise von GIA.
Die Vermutung von DAVIS (1966), GIA sei ein Trypsin-Inhibitor, hat sich durch die Untersuchungen mit Trasylol nicht bestätigt.
Die Annahme der WHO-SCIENTIFIC-GROUP, die gonadotropininhibierenden Substanzen seien niedermolekulare Kohlenhydrate, kann mit den hier angewandten Untersuchungsmethoden nicht ausgeschlossen werden.
Weiter bleibt ungeklärt, wo GIA gebildet wird: in der Hypophyse, im Hypothalamus oder im Corpus pineale.
Auf Grund der Tatsache, daß aus Rinderzirbeldrüsen Substanzen isoliert werden konnten, die Gonadotropin inhibieren, (SOFFER 1965, PAVEL 1966), und daß Pinealome Pubertas praecox verursachen, vermutet man hier die Bildungsstätte für GIA. Doch ist der Beweis noch nicht erbracht, daß diese gonadotropininhibierenden Substanzen mit denen aus Urinextrakt identisch sind.

Literaturverzeichnis:

1. Albert A., Kelly M.D.S., Silver L., Kobe J.
Extraction and purification of human pituitary gonadotrophin.
I.clin. Endocr. 18, 600-610 (1958)

2. Andreoli C., Vivali V., Cavallini R.
Antigonadotrophin in the supression of postpartum lactation in nonnursing mothers.
Gynaecologic 154/3, 154-155 (1962)

3. Arthur Mc., Ingersoll Fr., Worcester J.
The urinary excretion of interstitialcell and follicle stimulating hormone activity during the normal menstrual cycle.
I.clin. Endocr. 18, 1186-1201 (1958)

4. Apostolakis M., Voigt K.D.
Gonadotropine
Thieme-Verlag, Stuttgart 1957

5. Apostolakis M.
Experimentelle Grundlagen und klinische Bedeutung der Forschung auf dem Gebiet der menschlichen hypophysären Gonadotropine.
Klin. Wochenschrift 39, 453-460 (1961)

6. Apostolakis M., Bettendorf G., Voigt K.D.
Klin.-experimentelle Studien mit menschlichem hypophysärem Gonadotropin.
Acta Endocr. (Kbh) 41/2, 14-30 (1962)

7. Becker K.L., Albert A.
Urinary excretion of follicle stimulating and luteinizing hormones.
I.clin. Endocr. Metab. 25, 962-974 (1965)

8. Bell E.T., Mukerji S., Loraine I.S., Lunn S.F.
The relationship of gonadotrophin excretion of ovulation during menstrual cycle.
Acta Endocr. Copenhagen 51, 578-590 (1966)

9. Bettendorf G., Apostolakis M., Voigt K.D.
Darstellung von Gonadotropin aus menschlichen Hypophysen.
Acta Endocr. 41, 1-13 (1962)

10. Bierich J.R.
Über die zentrale Regulation der sexuellen Reifung, ihre Störungen und therapeutischen Möglichkeiten.
Acta Neurovegatativa XXX/1-4, 321-333 (1967)

11. Blobel R., Schlumberger H.D.
Über die zentrale Steuerung der weiblichen Gonadenfunktion.
Med. Welt 18, 3132-3141 (1967)

12. Blobel R., Schumacher G., Uhlig H., Mohr E., Schlumberger H.D.
Physikalisch-chem. und biochem. Untersuchungen über Choriongonadotropin.
Naturw. 47, 517-526 (1960)

13. Bourdel G., Li C.H.
Effect of rabbit antiserum to sheep pituitary ICSH and adult female rats.
Acta Endocr. (Kbh) 42/4, 473-479 (1963)

14. Brown P.S.
Human urnary gonadotrophins in relation to puberty.
I.Endocr. 17, 329-333 (1958)

15. Brown P.S.
Human urinary gonadotrophins in relation to the menstrual cycle, secondary amenorrhoe, and the response to oestrogen.
I.Endocr. 18, 46-50 (1959)

16. Brown P.S.
Urinary gonadotrophins in normal men.
Acta Endocr. 32, 272-283 (1959)

17. Brown P.S.
Human urinary gonadotrophins assayes by different responses in the same animal.
Acta Endocr. (Kbh) 34/3, 375-389 (1960)

18. Butt W.R.
Hormone Chemestry
Consultant Biochemist
Department of clinical Endocrinology
Unites Birmingham Hospital
D. van Nostand Company LTD LONDON 1964

19. Chamberlain G., Wood C.
Stein-Leventhal-Syndrom
Brit. med. J. 1, 96-98 (1964)

20. Davis J.C., Hyde T.A., Hipkin L.J.
Biological properties of urinary gonadotrophin inhibitor.
I.clin. Endocr. 22/10, 1123-1127 (1966)

21. Domini P., Puzzuoli D., Alessio D.
Purification of gonadotrophin from menopausal urine by gel-filtration on Sephadex.
Acta Endocr. (Hbh) 65, 329-334 (1964)

22. Futterweit W., Margolis S.A., Soffer L.J., Dorfman R.J.
Effect of urinary gonadotrophin inhibitor of the mouse uterine response to various gonadotrophins.
Endocr. 72/6, 903-907 (1963)

23. Hahn H.B., Albert A.
Of the presence of a gonadotrophin inhibiting material in human urine.
I.clin. Endocr. 25/3, 409-415 (1965)

24. Hayashida J.
Inhibition of spermiogenesis prostate and seminal vesicle in normal animals With anti-gonadotrophic hormone serum.
I. Endocr. 26/1, 75-83 (1963)

25. Helweg B.
Moderne Arzneimittel
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH
Stuttgart, 3. Aufl. 200-203 (1967)

26. Heinrichs V., Eulenfeld F.
Untersuchungen über die Extraktion von hypophysärem Gonadotropin aus Urin.
Act Endocr. Copenhagen 53, 5-48 (1960)

27. Hipkin L.J.
Gonadotrophin-Inhibiting-Properties of Kaolin-Acetone-Extracts of human urine.
I. Endocr. 38/1, 39-49 (1967)

28. Jores A., Nowakowski H.
Prakt. Endocrinologie
3. Auflage, 246-252
Thieme-Verlag, Stuttgart 1968

29. Johnsen S.G.
A clinical routine-method for the quantitative determination of gonadotrophins in 24-hour urine samples. Normal values for men and women ot all age groups from pre-puberty to senescence.
Acta Endocr. (Kbh) 31, 209-227 (1959)

30. Keller W., Wiskott A.
Lehrbuch der Kinderheilkunde
2. Auflage 138-159
Vogt D.: Störungen des Wachstums und der Entwicklung
Thieme-Verlag, Stuttgart 1966

31. Klinefelter H.F., Albright F., Griswold G.C.
Experience with a quantitative test for normal or decreased amounts of FSH in the urine in endocrinological diagnosis.
I.clin. Endocr. 3, 529-540 (1943)

32. Knappe G., Dörner G., Stahl F.
Nachweis hypophysärer Gonadotropine im Harn von Kindern.
Klin. Wochenschrift 39/18, 971-972 (1961)

33. Labhart A.
Klinik der inneren Sekretion
Springer-Verlag 1957 70-73

34. Landau B., Landau R., Schwartz H.S.
Presence of a gonadotrophin-inhibiting-factor in the urine of hypogonadotrophic-hypogonadal patients and further studies on its properties.
I.clin. Endocr. 25/3, 339-342 (1965)

35. Landau B., Schwartz H.S., Soffer L.J.
Presence of gonadotrophin-inhibiting-factor in the urine of young children.
Metabolism 9/1, 85-87 (1960)

36. Loraine J.A.
Pituitary Gonadotrophins
The clinical application of hormone assay
Chapter II, 15-64
E.S. Livingstone LTD
Edinbourgh and London 1958

37. Loraine J.A., Brown J.B.
Some observations of the estimation of gonadotrophins in human urine.
Acta Endocr. (Kbh) 17, 250-263 (1954)

38. Loraine J.A., Brown J.B.
A method for the quantitative determination of gonadotrphins in the urine of non-pregnant human subjects.
I. Endocr. 18, 77-84 (1959)

39. Loraine J.A., Mc Kay M.A.
A comparison of various extraction methods for urinary gonadotrhphins with special reference to yields.
I. Endocr. 22, 277-283 (1963)

40. Lunenfeld B.
Urinary gonadotrophins
Proceedings of the second internat. Congress of Endocrinology. 814-829
London 1964

41. Martius H.
Lehrbuch der Gynäkologie, 8. Aufl.
Thieme-Verlag, Stuttgart 1964

42. Orlandi B. , Abate F., Del Giudice C., Ferramosca A.
A certain data concerning a urinary factor with antigonadotrophic action in connection with puberty.
Arch.Path.clin. Med. 51/2, 115-123 (1964)

43. Ota M., Dronkert A.,Gates A.H.
The presence of a gonadotrophin-inhibiting-substance in human urine.
Fertil-Steril 19/1, 100-109 (1968)

44. Palas M., Jezdinska V., Komeda S.
Effect of urinary gonadotrophin-inhibiting-substances on the number of mitoses in seminal vesicles in rat.
Endocr. Exp. (Bratisl.) 1/3, 159-164 (1967)

45. Pavel S., Petrescu S.
Inhibition of gonadotrophin by a highly purified pineal peptide and by synthetic arginin-vasotocin.
Nature (London) 212/5066, 1054-1060 (1966)

46. Pigon H., Clegg M., Cole H.H.
The formation of antigonadotrophin in sheep and its effect on the endocrines and reproductive system.
Acta Endocr. 35, 253-260 (1960)

47. Presl J., Hersky J., Henzl M., Jirasek J.
The development of a feedback-mechanism between the ovary and the diencephalic-hypophysal system.
I. Endocr. 26, 287-288 (1963)

48. Reiss M., Pearse J.J., Davis R.H., Hillman J.C., Sidman M.B.
Inhibition of the biological action of gonadotrophin, thyreotrophin, and corti-cotrophin by small amounts of serum and cerebrospinal fluid.
I. Endocr. 29/1, 83-90 (1964)

49. Rifkind A., Kulin J., Ross M.
FSH and LH in the urine of prepubertal children.
I.clin. invest. 46/12, 1925-1931 (1967)

50. Rosemberg E., Keller P.J., Bulat G., Ferrechio G.B.
Studies related to the presence of a gonadotrophin-inhibiting-material in human urine.
I.clin. Endocr. 25/2, 1609-1615 (1965)

51. Rosemberg E., Lewes W., Russell E.
Performance control of preparations which could be used as reference material for the estimation of urine gonadotrophin in the mouse uterine weight method.
I.clin. Endocr. 22/10, 953-958 (1962)

52. Sakiz E., Guillemin R.
Potentation of the biologic activity by LRF from ox and sheep by synthetic argi-nino-vasopressin.
C.R. ACAD SCI, Paris 229/1, 237-240 (1964)

53. Sairam M.R., Madhwa, Ray H.G., Moudgal N.R.
Presence of a gonadotrophin-inhibitor in the urine of the bonnet monkey.
Endocr. 78/5, 923-928 (1966)

54. Sairam M.R., Madhwa, Ray H.G., Moudgal N.R.
Purification and properties of the follicle-stimulating hormone inhibitor obtained from the urine of the bonnet monkey.
I. Endocr. 40/2, 165-173 (1968)

55. Saito A.
The seperation of gonadotrophin-inhibiting-substance in the urine of children.
Canad. J. Bioch. 4310, 1711-1716 (1965)

56. Schneider H.P.G., Staemmler H.J., Sachs L., Glockner C.
Über die Wirkung von Gonadotropin-Inhibitor-Material aus Epiphysen und Urinextrakten.
Arch. Gyn. 206/1, 71-87 (1968)

57. Schwartz H.S., Mantel N.
A rapid bio-assay for chorionic-gonadotrophin and gonadotrophin inhibition.
I.clin. Endocr. 22/4, 393-398 (1962)

58. Soffer L.J., Fogel M.
Effect of urinary gonadotrophin inhibiting substance upon the action of human chorionic gonadotrophin and on human postmenopausal urinary gonadotrophin.
I.clin. Endocr. 23/9, 870-872 (1963)

59. Soffer L.J., Fogel M.
Urinary concentration of Gonadotrophin-(ICSH)-inhibiting-substance in Stein-Leventhal-Syndrom.
I.clin. Endocr. 24/7, 656-659 (1964)

60. Soffer L.J., Fogel M.
Urinary gonadotrophin (ICSH) inhibiting substance during the normal menstrual cycle.
I.clin. Endocr. 24/2, 651-655 (1964)

61. Soffer L.J., Fogel M., Rudavski A.Z.
The presence of a gonadotrophin inhibiting substance in pineal gland extracts.
Acta Endocr. 48/4, 561-564 (1965)

62. Soffer L.J., Fogel M., Rudavski A.Z.
Effect of urinary gonadotrophin inhibiting substance on the stimulating effect of human chorionic gonadotrophin upon the wheanling rat uterus.
I.clin. Endocr. Metab. 26, 355-357 (1966)

63. Soffer L.J., Futterweit W., Salvaneschy J.
A gonadotrophin-inhibiting-substance in the urine of normal young children.
I.clin. Endocr. 21/10, 1267-1271 (1961)

64. Soffer L.J., Salvaneschy J., Futterweit W.
A gonadotrophin-inhibiting-substance in the urine of normal subjects.
I.clin. Endocr. 22/5, 532-534 (1962)

65. Taymor M.C.
Excretion of FSH and ICSH in different phases of the normal menstrual cycle.
I.clin. Endocr. 21, 976-984 (1961)

66. Taymor M.C., Seravis C., Batt R., Goss D.A.
Immunologic reaction between extracts of human urinary gonadotrophin and anti-HCG.
Fertil and Steril 16/5, 579-585 (1965)

67. Weiser P.
Zur Hemmung der Gonadotropin-Wirkung durch Seren und Urinfaktoren.
Vortrag aus der Universitäts-Frauenklinik Münster, Prof. Dr.H. Goecke

68. Werff Ten Bosch J.J.
Control of puberty by endocrine and other factors.
Proc. of the II. internat. Congress of Endocrinology, 833-843
London 1964

69. Wilde L.E., Bagshawe K.D., Drewe A., Pallas W.
Reduction in the biological potency of HCG by antisera to human menopausal gonadotrophin.
I. Endocr. 32/1, 117-118 (1965)

70. Wolf A.
Antiserum to human pituitary follicle stimulating hormone.
Nature (London) 198/4887, 1308-1309 (1963)

71. Woods M.C., Simpson M.E.
Characterization of the anterior pituitary factor whisch antagonizes gonadotrophins.
Endocrinologiy 68/4, 647-661 (1961)

72. WHO-Scientific-Group
Immunologic aspects of human reproduction.
Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser. 334 (1966)

74. Yen S.S.C., Vicic W.S., Kearchner D.V.
Gonadotrophin levels in Puberty.
I.clin. Endocr. 29, 382-389 (1969)

Lebenslauf

Ich, Maria Theresia Schneider, wurde am 6. 12. 1942 als jüngstes Kind des Mühlenbesitzers Karl Schneider und seiner Ehefrau Maria, geb. Hausmann, in Scherlowitz, Kreis Mies/CSR geboren.
Mein Vater fiel am 17. 11. 1943 in Rußland.
Die Volksschule besuchte ich in Niederviehbach in Niederbayern.
Im Juli 1963 legte ich am Realgymnasium im Kloster-Seligenthal in Landshut/Bayern die Reifeprüfung ab.
Im Wintersemester 1963 begann ich das Medizin-Studium an der Universität in Tübingen, wo ich im Oktober 1964 die naturwissenschaftliche und im April 1966 die ärztliche Vorprüfung bestand.
Die klinischen Semester studierte ich ebenfalls an der Universität in Tübingen und bestand am 30. 7. 1969 das medizinische Staatsexamen.